

特异性玫瑰花试验检测抗麻疹细胞免疫功能——麻疹疫苗接种前后的变化

微生物学教研室 章鑫明 朱圣禾 严佩珩

先天性无丙球蛋白症儿童感染麻疹后临床过程与正常人相似,而胸腺功能缺陷者麻疹往往导致死亡,说明细胞免疫功能在抗麻疹免疫中十分重要。目前用于体外测定抗麻疹细胞免疫功能的方法有特异性淋巴细胞转化试验和移动抑制试验等,但所得结果不一。

特异性玫瑰花试验是一种特异、敏感的体外细胞免疫功能测定法^(1,2)。本实验用麻疹抗原特异性玫瑰花试验,检测麻疹抗原在体外对疫苗接种前后机体活性玫瑰花形成细胞(A-RFC)的激活作用以及激活率与血清麻疹血凝抑制抗体(HI)水平的关系。

材 料 和 方 法

一、研究对象 无自然麻疹和麻疹疫苗接种史、血清学证实麻疹HI抗体阴性($<1:2$)的8~25月龄健康婴幼儿47例,接种麻疹疫苗前采血(免前组),其中27例于种苗后第21天再次采血(免后组),以及于1972年初次、1979年再次接种麻疹疫苗的9~12岁健康儿童24例(再免组)。

二、麻疹抗原制备 麻疹病毒沪191疫苗株(上海生物制品研究所提供)接种于FL细胞,待75%以上细胞出现典型病变时,收获细胞和维持液,冻融三次,病毒滴度为 10^4 TCID₅₀/0.1ml。将冻融细胞悬液离心去除细胞碎片,上清分别经紫外线照射1小时(UV Ag)、37℃水浴2小时(37℃

Ag)和56℃水浴1小时(56℃ Ag)处理作为三种不同麻疹抗原,分装后低温保存备用。处理的病毒抗原除37℃ Ag中仍含少量活病毒(<10 TCID₅₀/0.1ml)外,UV Ag或56℃ Ag中病毒全部灭活。同法处理未感染的培养细胞悬液作为对照抗原(C Ag)。

三、麻疹特异性玫瑰花试验 取外周血以聚蔗糖—泛影葡胺(比重1.078)分离淋巴细胞,洗涤后配成 1×10^6 /ml淋巴细胞悬液,分装沉淀管,每管0.1ml,分别加入麻疹抗原或对照抗原0.1ml,混匀后37℃水浴2小时,再加0.05ml吸收小牛血清和0.1ml绵羊红细胞悬液浓度为 2×10^7 /ml,混匀后37℃水浴10分钟,500 rpm离心5分钟,弃上清,留沉淀0.1ml,加0.8%戊二醛0.05ml,4℃固定20分钟,吸出滴于玻片上铺平,自然干燥后染色,油镜计数200个淋巴细胞,结合3个或3个以上绵羊红细胞的淋巴细胞即为A-RFC。

四、血清麻疹抗体测定 以常规血凝抑制试验法检测。

结 果

一、抗原处理法及浓度的选择 为选择合适的抗原处理法及其浓度,将UV Ag、37℃ Ag和56℃ Ag分别作1:1、1:10和1:50稀释,三种不同浓度抗原与同一个体淋巴细胞共孵作为试验管,另设C Ag作为对照管。12例助血员淋巴细胞的各试验管和对照管的平均A-RFC%见表1。三种不

同浓度的UV Ag或37℃ Ag试验管的平均A-RFC%均较对照管的 22.5 ± 12.7 有所增高,其中以UV Ag 1:10抗原管(30.0 ± 15.5)和37℃ Ag 1:10抗原管(32.2 ± 12.9)增高最为明显。56℃ Ag试验管的平均A-RFC%,除1:10抗原管稍有增高外,与对照管差别不大。根据试验结果,我们选择1:10稀释的UV Ag和37℃ Ag作为试验用抗原。

表1 各管平均A-RFC百分率

例数	抗 原	平 均 A-RFC%		
		1:1	1:10	1:50
12	UV Ag	26.0 ± 14.6	30.0 ± 15.5	29.7 ± 17.3
	37℃ Ag	25.1 ± 12.0	32.3 ± 12.9	28.0 ± 15.6
	56℃ Ag	22.6 ± 14.9	26.2 ± 14.9	22.3 ± 11.4
	C Ag	22.5 ± 12.7		

二、抗原对不同免疫史机体A-RFC%的影响 抗原对三组不同免疫史机体A-RFC%的影响见表2。免前组47例婴幼儿淋巴细胞经麻疹抗原作用后,UV Ag和37℃ Ag试验管平均A-RFC%分别为 29.9 ± 12.0 和 27.7 ± 11.2 ,与对照管 30.1 ± 9.6 无明显差异($P > 0.05$)。免后组27例婴幼儿的UV Ag和37℃ Ag试验管平均A-RFC%分别为 35.9 ± 11.4 和 34.1 ± 10.9 ,对照管为 27.8 ± 11.1 ,两者相比,试验管较对照管平均增长分别为29.1%和22.7%,有显著性差异($P < 0.05$)。再免组24例儿童的UV Ag和37℃ Ag试验管平均A-RFC%分别为 47.5 ± 10.3 和 46.8 ± 10.5 ,对照管为 39.4 ± 9.3 ,前者较对照管平均增长分别为20.6%和18.8%,亦有显著性差异($P < 0.05$)。

表2 各组平均A-RFC百分率

组 别	例 数	UV Ag	37℃ Ag	C Ag
免前组	47	29.9 ± 12.0	27.7 ± 11.2	30.1 ± 9.6
免后组	27	35.9 ± 11.4	34.1 ± 10.9	27.8 ± 11.1
再免组	24	47.5 ± 10.3	46.8 ± 10.5	39.4 ± 9.3

三、A-RFC激活率及其与血清抗体的关系 以激活率(激活率=

$$\frac{\text{试验管A-RFC\%} - \text{对照管A-RFC\%}}{\text{对照管A-RFC\%}}$$

$\times 100\%$)表示麻疹抗原对受试者A-RFC的激活作用,表3中见各组受试者的A-RFC平均激活率不同:免后组A-RFC平均激活率最高,UV Ag和37℃ Ag分别为46.5%和33.5%;再免组次之,UV Ag和37℃ Ag分别为27.8%和23.9%;UV Ag对免前组A-RFC未现激活作用,而37℃ Ag对免前组A-RFC不仅未能激活,反有抑制作用,其平均激活率为-19.4%。

表3 各组A-RFC平均激活率

组 别	例 数	平 均 激 活 率 %	
		UV Ag	37℃ Ag
免前组	47	-2.4	-19.4
免后组	27	46.5	33.5
再免组	24	27.8	23.9

以样本均数99%可信限计算,本实验免后组和再免组平均激活率的99%可信限下限在8.2%,而免前组的上限在7.2%,因此,本次实验以激活率 $\geq 8\%$ 判为阳性。根据该标准,免后、再免、和免前组受试者阳性激活率分别为66.7%、66.7%和29.8%,免后组和再免组明显高于免前组。

27例婴幼儿麻疹疫苗接种前后A-RFC激活率变化见图1,两种抗原对A-RFC的激活率,免疫后除4例较免疫前所下降外,其余23例(85.2%)均较免疫前有不同程度增高,27例婴幼儿A-RFC平均激活率从免疫前-4.5%(UV Ag)和-21.4%(37℃ Ag)分别增至46.5%和33.5%。

图2示UV Ag对免后组和再免组各例A-RFC激活率及其与血清HI抗体滴度的关系,表明其A-RFC激活率与抗体滴度间无明显相关性($P > 0.05$)。免后组各例的抗体滴度均有增高,从 $< 1:2$ 升至 $1:2$

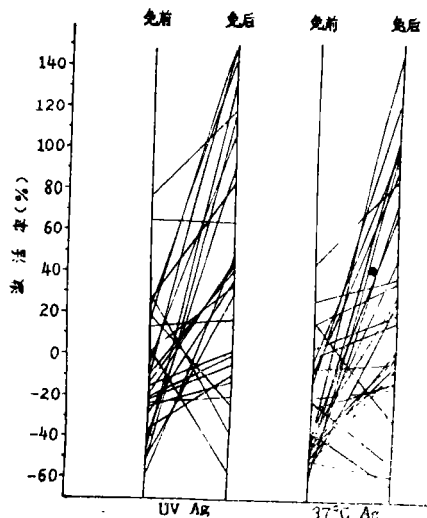


图1 抗原对27例婴幼儿免疫前后A-RFC的激活率

~1:64 (GMT23.8)。A-RFC激活率在免疫后未上升的4例,抗体滴度则有明显增高。再免组抗体滴度在1:2~1:32 (GMT 12.0),与A-RFC激活率间也无显著相关性。37°C Ag 试验结果与UV Ag 相似。

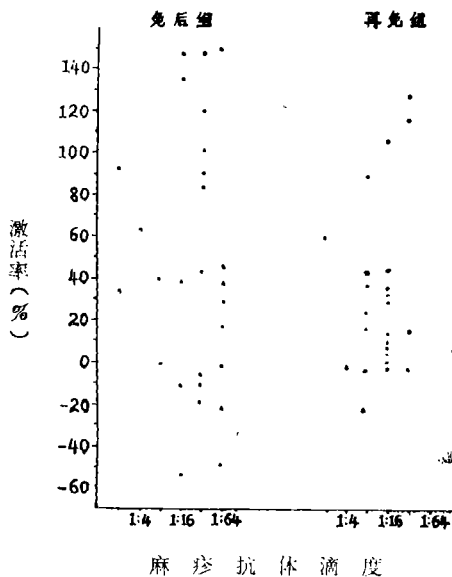


图2 UV Ag对A-RFC的激活率与麻疹血凝抑制抗体滴度的关系

讨 论

本实验结果表明,有麻疹免疫史者的淋

巴细胞在体外经麻疹抗原作用后形成的A-RFC%,其试验管比对照管显著增多,而无自然麻疹和免疫史者的淋巴细胞经抗原作用后的A-RFC%与对照管无明显差异,提示麻疹抗原可特异性地激活有免疫力机体的淋巴细胞,使其形成A-RFC能力增强。Felsburg等曾用结核菌素纯蛋白衍生物和土拉伦菌素两种抗原,与皮试阳性或阴性者淋巴细胞共孵后,皮试阳性者淋巴细胞形成的A-RFC%在试验管比对照管显著增高,而皮试阴性者则否⁽¹⁾。

麻疹抗原对不同免疫史者A-RFC的激活作用不同,免后组A-RFC的平均激活率较再免组为高,可能因前者为麻疹近期免疫者,而再免组的免疫史较长。UV Ag对免前组A-RFC无明显激活作用,37°C Ag对其不仅未能激活,反现抑制,可能由于抗原残存活病毒作用所致。Galama等体外测定淋巴细胞的细胞毒作用和IgM合成能力,发现早期加入麻疹病毒对淋巴细胞细胞毒作用和IgM合成均有抑制作用,而晚期加入病毒则无,因此认为麻疹病毒只能抑制淋巴细胞免疫功能的建立,而对已建立的免疫功能无明显抑制作用⁽³⁾;似可解释在实验中37°C Ag对免前组A-RFC的抑制现象,而对其他两组作用不显著。

本实验中麻疹抗原对多数有麻疹疫苗接种史者A-RFC有激活作用,但各例A-RFC激活率与其血清HI抗体滴度间无显著相关性。Gallagher等测定麻疹感染或疫苗接种者的麻疹特异性淋巴细胞转化反应及其与HI抗体滴度的关系,发现80~90%抗体阳性者,其淋巴细胞受麻疹抗原刺激后发生转化,但转化率与抗体水平无相关性⁽⁴⁾。Bear等用麻疹抗原进行白细胞移动抑制试验测定24例婴幼儿麻疹疫苗接种前和接种后4周的细胞免疫水平,也发现其与抗体滴度无关⁽⁵⁾。

实验显示抗原对A-RFC的激活作用与抗原处理有关,56°C Ag对A-RFC的激活不

明显,可能因其在加热处理中抗原性受影响所致;UV Ag激活作用明显,提示其抗原性较强。用台盼蓝染色证明加抗原孵育后淋巴细胞存活率与未加抗原孵育前无甚变化,表明抗原短期处理并不影响淋巴细胞的存活。

Agbata发现特异性抗原在体外刺激有相应免疫力机体的T淋巴细胞后,能使其产生玫瑰花激活因子,因而使A-RFC%增高⁽⁶⁾。Kubota也证实抗原与淋巴细胞共孵两小时后,上清中即能检出玫瑰花激活因子,该因子主要激活T淋巴细胞,尤其作用于活性玫瑰花的形成,而对总玫瑰花影响不明显⁽⁷⁾。也有认为试验管A-RFC%增高可能与淋巴细胞表面超微结构改变有关⁽⁸⁾。至于麻疹抗原对淋巴细胞激活的机制尚待进一步探讨。

参 考 文 献

1. Felsburg P J, et al: J Immunol 118(1): 62, 1977
2. 王凯华: 北京医学 1(3): 139, 1979
3. Galama J M, et al: Cell Immunol 50(2): 405, 1980
4. Gallagher M R, et al: Am J Dis Child 135(1): 48, 1981
5. Bear C, et al: Clin Immunol Immunopathol 19(3): 452, 1981
6. Agbata A I, et al: J Immunol 122(3): 1,080, 1979
7. Kubota M, et al: Clin Exp Immunol 40(3): 602, 1980
8. Roath S, et al: Nature 273(5,657): 15, 1978

(紧接第25页) 在应用等量5-FU后,腹腔注射组小鼠平均大肠肿瘤数及8cm肠段重量与对照无显著差异($P>0.05$),而直肠给药组则该两项指标均显著低于对照($P<0.01$)。提示经直肠给5-FU可能在大肠肿瘤组织内达到较高浓度。

直肠给药的两组30只小鼠给药期间有1只死亡(1/30只),腹腔给药组13只小鼠给药期间死亡3只(3/13只)。虽然本实验腹腔给药组小鼠死亡率似高于直肠给药组,但由于样本数较少,其确切含义尚待进一步实验阐明。

参 考 文 献

1. Friedman M A: Cancer Treatment Reviews 7: 205, 1980
2. 耿宝琴、徐学儒: 浙江肿瘤通讯(4): 58, 1977

3. 上一医卫生计教研组: 医学统计方法, 第34页, 上海科技出版社, 1979
4. 陆明廉等: 上海第一医学院学报 7(6): 456, 1980
5. 上海市劳动卫生职业病防治院: 分析化学(5): 367, 1975
6. 施新猷主编: 医学动物实验方法, 第445页, 人民卫生出版社, 1980
7. Thurnherr N, et al: Cancer Res 33: 940, 1973
8. Maskens A P: Cancer Res 41: 1240, 1981
9. Boffa L C, et al: Cancer Res 40: 1774, 1980
10. Szakal A K, et al: Cancer Res 40: 2475, 1980
11. Corbett T H, et al: Cancer 40: 2,660 (Supplement), 1977
12. 耿宝琴、朱永廉: 浙江医科大学学报 11(6): 269, 1982
13. Chang W W: J Natl Cancer Inst 60: 1,405, 1978